

Cytomegalovirus 感染症における 感染防禦機構に関する研究

II. 特異的細胞性免疫の成立とその意義

田 村 正

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨教授)

Studies on Immune Defence Mechanism in Human Cytomegalovirus Infection

II. The Role of Specific Cell-Mediated Immune Response in Human Cytomegalovirus Infection

Tadashi TAMURA

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Nakao)

The role of specific cell-mediated immune response in human cytomegalovirus (CMV) infection was studied by an *in vitro* lymphocyte transformation (LTF) test using whole blood culture.

Investigations were done in 5 groups of subjects; (1) 50 seropositive children and adults, (2) 19 seronegative subjects and 6 cord bloods, (3) 6 patients of primary immunodeficiency (4) 22 immunocompromised hosts and (5) 6 infants with congenital CMV infection and their mothers.

Results were briefly as follows:

1. Lymphocyte proliferation to phytohemagglutinin (PHA) was intact in all subjects except for the immunocompromised hosts on prolonged therapy, each one patient with congenital CMV infection and primary immunodeficiency.

2. No significant lymphocyte proliferation to CMV was observed in the seronegative subjects and cord blood. The stimulation indexes (SI) were all under 2.0. Positive lymphocyte proliferation ($SI > 2.0$) to CMV was obtained in all but one subjects of the seropositive children and adults (mean $SI = 27.9$). In terms of SI, with 2 times stimulations as the lowest value considered positive, the test was still specific.

3. CMV-induced *in vitro* lymphocyte proliferation was mainly dependent on the presence of sensitized T-lymphocytes.

4. Age related difference was recognized in CMV-LTF responses. The responses were generally low ($p < 0.025$) in infants (mean $SI = 5.7$) and higher in older children (mean $SI = 36.7$) and adults (mean $SI = 52.6$).

5. CMV-directed lymphocyte proliferation was lower in 15 children who were excreting CMV in urine when tested (mean $SI = 7.3$) than in 17 seropositive children who were not excreting the virus (mean $SI = 19.8$).

6. Immunological discrepancies between serovirologic results and cellular response were observed in the peculiar clinical entities, namely, primary immunodeficiency, immunocompromised hosts and congenital CMV infection.

- 1) Three out of 5 seronegative patients with B-cell deficiency showed positive lymphocyte response to CMV. In contrast, a patient with ataxia-telangiectasia who was shedding the virus in urine showed cellular response neither to CMV antigen nor to PHA.

- 2) In immunocompromised hosts, lymphoproliferative response to CMV antigen decreased following extensive and prolonged immunosuppressive therapy.

- 3) Heterogeneity was recognized in cellular response of congenital CMV infection. CMV-specific cellular immune defect was found in 2 out of 6 patients with congenital infection.

(Received July 11, 1978 and accepted September 5, 1978)

1 序 言

一般的にウイルス感染症の感染防禦としては、治癒機転において細胞性免疫が重要な役割を演ずることは、原発性免疫不全症候群の病理と易感染性に関する臨床的觀察から經驗的に知られていたが、最近いくつかのウイルス感染症において病原特異的細胞性免疫を試験管内で検出し得るようになり¹⁻⁷⁾、この分野の研究が進展した。

Cytomegalovirus (CMV) 感染症では、すでに報告されているように⁸⁻¹¹⁾、細胞性免疫の障害されている宿主においてウイルス排泄が多く認められること、血清抗体の上昇にもかかわらずウイルス排泄は持続的に認められること、および第1編で明らかにしたように、感染因子の排除における局所抗体の役割も十分ではないことなどから、本感染症に対する感染防禦機構の成立には、特異的細胞性免疫の樹立が第一義的であることが示唆される。

本研究で著者は、細胞性免疫機構を検索する手技として一般化されている lymphocyte transformation (LTF) 試験¹²⁾を用い、ヒト CMV 感染症における特異的細胞性免疫の成立と意義を明らかにする目的で、小児および健康成人を対象として CMV-LTF 反応に解析を加えた。更に、CMV 先天感染児、immunocompromised hosts、原発性免疫不全症候群など、いくつかの特殊な病態を示す症例を臨床モデルとしてとらへ、それらの症例における特異的細胞性免疫の態度についても解析を試みた。

2 実験材料と方法

2.1 研究対象

対象は、種々の主訴で札幌医科大学小児科外来を1977年6月から1978年2月までに受診した患児、および入院中の患児とした。成人対象は、医療従事者とした。その内訳は、(1)種々の疾患をもつが、免疫学的異常をもたない乳幼児および健康成人、(2)原発性免疫不全症の患児、(3)種々の免疫抑制剤あるいは抗腫瘍剤の投与を受けている immunocompromised hosts (4)先天性 CMV 感染症児およびその母親、とした。これらの対象について、末梢静脈血より、ヘパリン加採血を行った。同時に尿よりの CMV 分離を試みた。また正常分娩による胎盤から得られた臍帯血リンパ球についても検討を加えた。各々の採血から得られた血清は、 -20°C に保存した。

2.2 ウイルス分離および血清抗体価の測定

尿、口腔よりのウイルス分離および補体結合 complement fixing (CF) 抗体価の測定は、第1編に記載したごとく行った。なお、CF 抗体測定に用いた抗原は、LTF 試験に際して用いた抗原と同一の Lot より作製されたもの

である。

2.3 Lymphocyte Transformation 試験

2.3.1 抗原

2.3.1.1 CMV 抗原: CMV の標準株で、Baylor 医科大学 Dr. Benyesh-Melnick より分与を受け、教室で継代保存していた AD-169 株¹³⁾を使用した。ウイルスの増殖には、CMV に感受性を有するヒト胎児肺由来線維芽細胞 (human embryonic lung fibroblast, HEF) を使用した。抗原液の作製は、第1編に記載した CF 抗原の作製に準じ、glycine buffer による抽出法^{14,15)}を用いた。box titration による CF 抗原力価は、256 単位であった。

抗原は、Eagle's minimal essential medium (MEM) にて18時間透析後、 -80°C にて凍結保存した。使用前に、10ワットの UV (ultraviolet) ランプを用い、直下10 cm の距離で、60分間照射し不活化した。これを RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, add NaHCO_3 2 g/L, 1N HCl 3 mL/L, KM 60 mg/L) 培養液にて1:2, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 の各濃度に希釈して使用した。UV 照射後に、抗原の感染価を microplaque 法¹⁶⁾により測定し、ウイルスの不活化を確認した。

対照抗原は、CMV 非感染 HEF を用い、同様の方法にて作製し、使用した。なお、本研究において使用した抗原はすべて同一 Lot である。

2.3.1.2 Herpes zoster virus (HZV) 抗原: HZV 抗原は、大阪大学微生物病研究所より分与を受けた川口株を使用し、CMV 抗原の作製に準じた。

2.3.1.3 標準 mitogen: 標準 mitogen としては、purified phytohemagglutinin (PHA_p, Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA) を使用した。PHA_p は、RPMI 1640 培養液に溶解し、 10^{-1} , 10^1 , 10^2 , $10^3 \mu\text{g/ml}$ の各濃度に調整し、これを使用した。

2.3.2 培養および Harvest

リンパ球の培養は、全血培養法¹⁷⁻¹⁹⁾に基づいて行った。すなわち、対象小児および健康成人より得られたヘパリン血を、RPMI 1640 培養液にて一律に、小児は15倍に、成人は10倍に希釈した。そのリンパ球数は、約 $2 \times 10^5/\text{ml}$ であった。これを各試験管に0.5 mL ずつ分注し、 37°C 、5% CO_2 -incubator にて培養した。CMV 抗原あるいは HZV 抗原を、1:2~1:1024 の各濃度で、1本の試験管に0.05 mL ずつ加え、6~8日間の培養を行った。PHA_p を加えた系列は、3日間の培養を行った。抗原の各濃度につき、培養試験管3本ずつを用いた。培養終了の24時間前に、 $10 \mu\text{Ci/ml}$ に調整した [^3H] thymidine (^3H -TdR; The Radiochemical Centre Amersham England) を各試験管に0.05 mL ずつ添加した。

培養終了後、各試験管を 3% acetic acid 4 ml で洗滌し、2500 rpm、10 分間遠心、上清除去、4 ml の methanol で洗滌し、2500 rpm、10 分間遠心、上清除去を行った。この操作を各々 2 回ずつ行った後に、0.6N-NCS (NCSTM Solubilizer, Amersham/Seale Corporation) 1 ml を加え、water bath で 60°C、30 分間の incubation を行った。次に、9 ml の scintillation fluid (2, 5-diphenyl oxazol 6 g; 1, 4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzen 100 mg; toluen 1000 ml) を加え、radioisotope count 用バイアルにつめた後に、liquid scintillation counter (Packard LS-3255, liquid scintillation spectrometer) で、その radioactivity を測定した。測定値は 3 本のバイアルより得られた値の平均 cpm (count per minute) として求め、必要に応じて stimulation index (SI = cpm of stimulated cell/cpm of unstimulated cell) を算定した。

2.3.3 T-cell enriched fraction および T-cell depleted fraction の採取

T-cell enriched fraction (TEF) および T-cell depleted fraction (TDF) の採取は、ロゼット形成による方法²⁰⁻²²⁾に基づいて行った。すなわち、ヘパリン加末梢静脈血を Ficol-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden) で比重遠心²³⁾ (1500 rpm, 30 分間) を行い、末梢血リンパ球を採取、 $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整後、これを、5% SRBC (sheep red blood cell) と 1:20 の比で混じ、800 rpm、5 分間遠心の後、4°C、60 分間静置して E-rosette を形成する。これを再び Ficol-Hypaque にて比重遠心 (2500 rpm, 30 分間) を行い、TEF と TDF とに分離した。下層の TEF は、Tris-NH₄Cl buffer (pH 7.4) を用い、37°C、5 分間の incubation にて SRBC を溶血せしめ、PBS (phosphate buffered saline, 0.02 M, pH 7.2) で洗滌した後に、TDF は PBS で洗滌後に、56°C、30 分間にて非燐化したヒト AB 型血清を 10% に加えた RPMI 1640 培養液で、それぞれ細胞数を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、各試験管に分注した。これに前述の濃度に調整した CMV 抗原および PHA_p ($10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、37°C、5% CO₂-incubator にて培養した。

なお、本培養系に用いた AB 型ヒト血清は、CMV に対する血清抗体を保有しない健康成人血清であり、そのリンパ球は CMV に対する LTF 反応を示さなかった。

3 成績

3.1 抗原の検討

3.1.1 標準 mitogen (Fig. 1)

4 段階の希釈濃度に対するリンパ球の LTF 反応は、PHA_p 濃度が $10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$ において最も高い反応を示した。

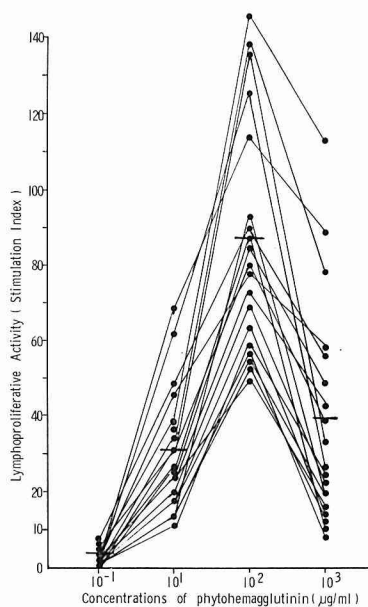


Fig. 1 Dose Response curves of Lymphocyte Transformation with Phytohemagglutinin.

Table 1 Lymphocyte transformation with phytohemagglutinin ($10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$) in the different age groups

Age	N	Mean S. I. \pm 1 SD
<1 yr	10	91.0 \pm 34.3
1-5 yr	17	97.1 \pm 34.2
6-15 yr	10	135.5 \pm 47.7
Adults	17	135.3 \pm 55.2

SI の mean \pm 1 standard deviation (M \pm 1 SD) は、 81.6 ± 34.6 であった。従って以後の実験においては、 $10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整された PHA_p を用いた。次に、各年齢層における反応の度合を調べた (Table 1)。6-15 yr において最も高値をとる傾向が認められたが、各年齢層間に有意の差は認めなかった。

3.1.2 CMV 抗原

3.1.2.1 対照抗原の検定 (Fig. 2): 対照抗原による LTF 反応はおこらないことを確認する目的で行った。図は、縦軸に cpm を、横軸に培養時間を示した。CMV に対する CF 抗体陽性ならびに陰性の対象について検索した。対照抗原添加群と培養液のみの群とでの ³H-TdR の取り込み率は、いずれも 200~1000 cpm であり、このことから、CMV-CF 抗体の存在の有無にかかわらず、また

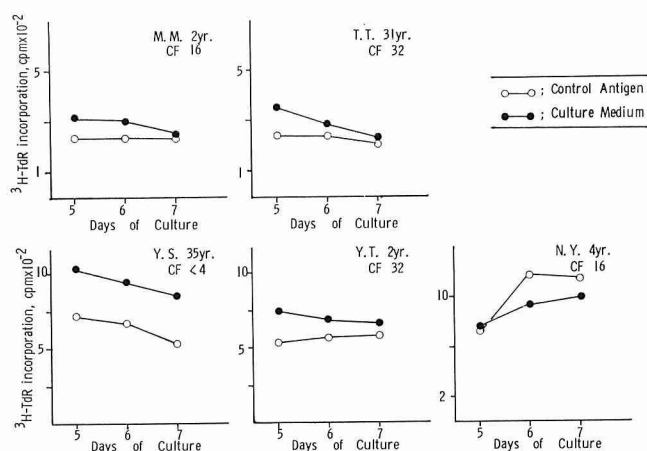


Fig. 2 Kinetic Curves of Lymphocyte Transformation with Control Antigen and Culture Medium.

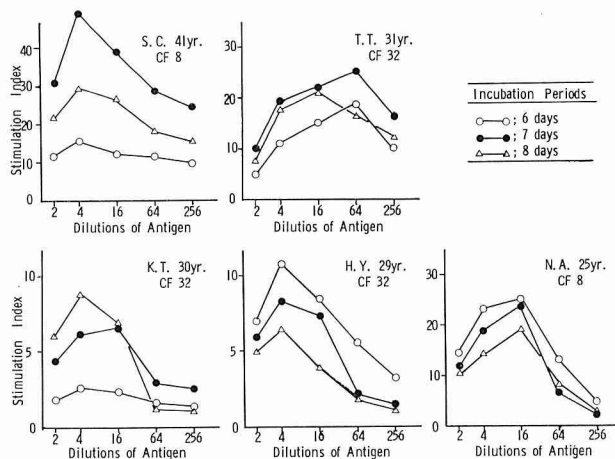


Fig. 3 Kinetic Curves of Lymphocyte Transformation with Cytomegalovirus Antigen.

培養時間ともかわりなく、対照抗原による LTF 反応は認められないことが確認された。

3.1.2.2 至適培養時間の決定 (Fig. 3): CMV-CF 抗体を有する健康成人を対象として培養時間の変化に伴う LTF 反応の変動曲線を示した。縦軸に SI を、横軸に抗原希釈濃度を示した。培養時間は、6 日、7 日、8 日とした。培養時間により LTF 反応の程度は異っており、いずれか一系列のみの培養時間では、反応のピークを十分に捕捉できないことがわかった。6 日および 7 日間の培養を行うことにより、LTF 反応のピークを含むことが明らかにされたので、以後の実験では、培養時間を 6 日および 7 日の 2 系列とし、いずれか一方のうち、高い LTF 反応を示した値を採用した。

3.1.2.3 至適抗原濃度の決定 (Fig. 4): CMV-CF 抗

体を有する対象 7 名、有しない対象 4 名の計 11 名の健康成人リンパ球について、抗原濃度の変化に伴う LTF 反応の様相に検討を加えた。縦軸に SI を示し、横軸に 1:2 から 1:1024 までの抗原希釈濃度を示した。図中の実線で示した 7 例は、CMV に対する抗体を保有する対象であるが、これらでの反応は、4 倍から 64 倍までの抗原希釈濃度でピークを示し、よい反応が得られた。以降の実験では、特殊な場合 (先天性 CMV 感染症、原発性免疫不全症、その他) を除いては、1:4, 1:16, 1:64 の 3 段階の抗原濃度を用い、その内の最高値を実験成績として用いた。反応の程度と血清 CF 抗体価の高低とは関連を認めなかった。

抗体陰性の 4 例の対象では、いずれの抗原濃度にも LTF 反応は全く認められず、全例で、SI 値 2 未満であった。

3・1・3 CMV 抗原の特異性の検討 (Table 2)

LTF 反応の抗原特異性を確認する目的で、7 症例について、同じ Herpes 群ウイルスである HZV 抗原を加えた系と、CMV 抗原を加えた系を同時に作製し、その LTF 反応を検討した。

それぞれの症例については、Case 1 と Case 2 では、CMV と HZV いずれの血清抗体も保有し、CMV、HZV いずれの抗原に対しても LTF 反応は陽性であった。しかし、Cases 3, 4, 5. は、HZV に対する血清抗体を保有せず、HZV-LTF 反応は認められなかった。Case 6 は、HZV にのみ感染歴を有し、HZV にのみ LTF 反応を示した。Case 7 は、両方の血清抗体を保有せず、LTF 反応も CMV、HZV 両抗原に対して何らの反応も示さなかった。

3・2 Lymphocyte transformation 試験の

陽性限界の検討

Table 3 に、健康成人 16 例の CMV-LTF 試験の結果

Table 2 Specificity of in vitro lymphocyte transformation with cytomegalovirus and herpes zoster virus antigens in healthy adults and children

Cases	Antibody titer*		Lymphoproliferative Activity				
	CMV	HZV	Control** (cpm ; M ± 1 SD)	CMV (cpm ; M ± 1 SD)	SI	HZV (cpm ; M ± 1 SD)	SI
1. 28 yr M	8	8	127 ± 14	366 ± 23	2.9	3576 ± 861	28.2
2. 3 yr F	16	16	242 ± 67	650 ± 25	2.7	971 ± 234	4.0
3. 9 m M	32	<4	852 ± 52	4077 ± 687	4.8	760 ± 127	0.9
4. 1 yr M	8	<4	190 ± 2	1113 ± 308	5.9	260 ± 40	1.4
5. 2 yr F	16	<4	319 ± 18	2347 ± 497	7.4	294 ± 71	0.8
6. 1 yr F	<4	64	554 ± 81	778 ± 138	1.4	196 ± 32***	4.1
7. 10 m F	<4	<4	77 ± 6	90 ± 20	1.2	88 ± 8	1.1

Cases 1 and 2 were immune against CMV and HZV, Cases 3, 4 and 5 against CMV only. Case 6 against HZV only. Case 7 was not immune against both CMV and HZV.
* Complement fixing antibody titer. ** Control antigen. *** Done by micromethod. Lymphoproliferative activity with control antigen was 48 ± 7 cpm.

Table 3 Lymphocyte transformation test with cytomegalovirus antigen in 16 healthy adults

Cases	Age/ Sex	CMV CF Titer	Lymphoproliferative Activity			Cases	Age/ Sex	CMV CF Titer	Lymphoproliferative Activity		
			Control (cpm ; M ± 1 SD)	CMV (cpm ; M ± 1 SD)	SI				Control (cpm ; M ± 1 SD)	CMV (cpm ; M ± 1 SD)	SI
1. 31 yr M		32	536 ± 54	11181 ± 677	24.8	9. 28 yr M		8	210 ± 17	21763 ± 1700	103.8
2. 26 yr F		16	243 ± 29	6496 ± 936	26.8	10. 27 yr F		8	205 ± 15	20554 ± 1471	100.4
3. 33 yr F		32	357 ± 36	3123 ± 283	8.8	11. 32 yr M		16	129 ± 14	14294 ± 1024	110.9
4. 42 yr M		8	408 ± 28	19186 ± 3245	47.0	12. 31 yr M		8	447 ± 24	87828 ± 5446	196.5
5. 50 yr F		16	340 ± 68	2051 ± 343	6.0	13. 33 yr M		<4	347 ± 23	462 ± 31	1.3
6. 45 yr F		16	248 ± 24	3081 ± 778	12.4	14. 29 yr F		<4	456 ± 24	334 ± 98	0.7
7. 25 yr F		8	194 ± 34	4728 ± 838	24.4	15. 35 yr M		<4	651 ± 127	1098 ± 101	1.7
8. 24 yr F		8	271 ± 29	4722 ± 527	17.4	16. 29 yr M		<4	252 ± 16	289 ± 22	1.1

The counts shown are the highest count obtained from the 3 dilutions of antigen used.

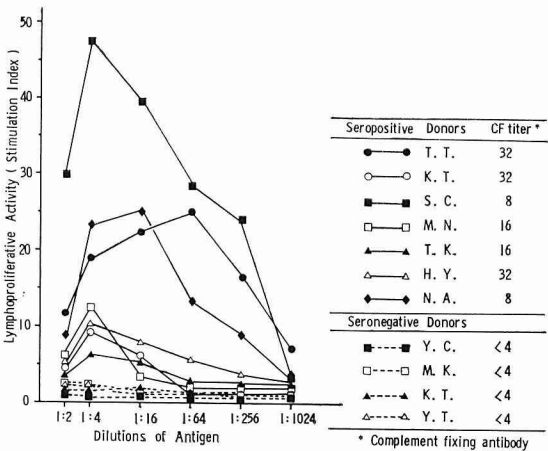
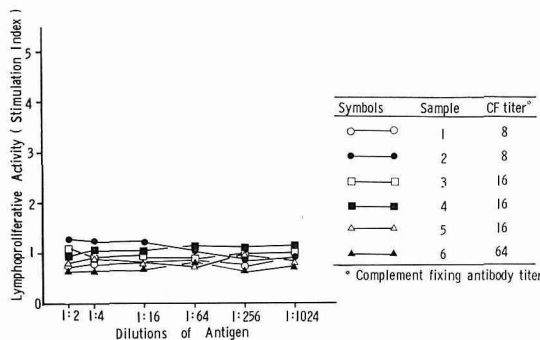


Fig. 4 Dose Response Curves of Lymphocyte Transformation with Cytomegalovirus Antigen in Eleven Healthy Adults.

Table 4 *Lymphocyte transformation with cytomegalovirus antigen in 20 children with various diseases*

Cases	Age/Sex	Diseases	CMV CF Titer	Virus Iso- lation	Lymphoproliferative Activity			
					Control (cpm ;	CMV M \pm 1 SD)	SI	
1.	8 m	M	Hydrocephalus	16	+	475 \pm 83	2248 \pm 240	4.7
2.	4 m	M	Hepatosplenomegaly	8	+	351 \pm 91	1690 \pm 416	4.8
3.	8 m	M	Hepatosplenomegaly	32	+	338 \pm 63	2413 \pm 689	7.2
4.	1 yr	M	Hepatitis	64	+	408 \pm 50	5813 \pm 640	19.2
5.	1 yr	M	Hepatosplenomegaly	16	+	491 \pm 93	8970 \pm 373	18.3
6.	1 yr	M	Gastroenteritis	32	+	489 \pm 19	1705 \pm 136	3.5
7.	8 m	M	Hepatitis	32	+	430 \pm 94	6094 \pm 886	14.2
8.	8 m	M	Infectious mononucleosis	16	+	365 \pm 73	1934 \pm 23	5.3
9.	1 yr	F	Hypoalbuminemia	64	+	884 \pm 113	1621 \pm 77	1.8
10.	9 m	M	Infantile spasmus	32	+	853 \pm 52	3266 \pm 277	3.8
11.	1 m	F	Hepatitis	16	—	335 \pm 11	694 \pm 80	2.1
12.	5 yr	F	Pneumonia	8	—	118 \pm 9	446 \pm 23	3.8
13.	12 ry	M	Anemia	8	—	292 \pm 36	2182 \pm 235	7.5
14.	14 yr	M	Arrhythmia	8	—	416 \pm 48	22231 \pm 4329	53.8
15.	9 yr	M	Epilepsy	8	—	309 \pm 13	7623 \pm 838	24.0
16.	13 yr	M	Arrhythmia	8	—	207 \pm 19	15473 \pm 4734	74.7
17.	2 yr	M	Congenital heart disease	<4	—	246 \pm 36	251 \pm 31	1.0
18.	6 m	F	Pharyngitis	<4	—	241 \pm 15	246 \pm 7	1.3
19.	6 yr	F	Asthma bronchiale	<4	—	342 \pm 10	309 \pm 30	0.9
20.	5 yr	M	Pneumonia	<4	—	335 \pm 9	296 \pm 67	0.9

The counts shown are the highest count obtained from the 3 dilutions of antigen used.

**Fig. 5** Dose Response Curves of Lymphocyte Transformation with Cytomegalovirus Antigen in Six Cord Bloods.

を平均 cpm および SI で示した。CMV 対照抗原による LTF 反応は、血清 CF 抗体保有の有無にかかわらず、337 \pm 133 cpm であった。CMV 血清抗体を保有していない症例では、CMV 抗原に対しては、何らの LTF 反応も示さず、全例で、SI 値は 2 未満であり、これを LTF

反応陰性とした。血清抗体を保有する症例での反応は、個体差が大きかったが、全例で、SI 値 2 以上であり、これを LTF 反応陽性とした。SI 値 100 以上を示す症例も検出された。

Table 4 に、20 例の種々の疾患を有する小児について血清 CF 抗体価、ウイルス排泄と LTF 試験についてまとめた。血清抗体を保有しない患児では、LTF 反応は認められず、全例で SI 値 2 未満であった。血清抗体を有する患児では、一例を除く全例で、SI 値 2 以上であった。

Fig. 5 に、臍帯血における CMV-LTF 試験の成績を示した。臍帯血では、母体由来の抗体を有していたが、CMV-LTF 反応は、いずれの抗原濃度においても認められなかった。

3.3 T-cell enriched fraction と T-cell depleted fraction の CMV-LTF 試験 (Table 5)

CMV-LTF 反応の主体を担うリンパ球が、T-cell なのか B-cell にあるのかについて検索を進めた。Table 5 は、2 例の CMV 血清抗体を保有する健康成人について、

Table 5 *Lymphocyte transformation with cytomegalovirus antigen in T-cell enriched fraction and T-cell depleted fraction*

Cases	Lymphocyte Proliferation					SI
	Control (cpm; M \pm 1 SD)	CMV (cpm; M \pm 1 SD)	SI	Control (cpm; M \pm 1 SD)	PHA (cpm; M \pm 1 SD)	
S. C.: W. B.	409 \pm 29	16282 \pm 1755	39.8	395 \pm 59	39520 \pm 9039	100.1
T. E. F.	309 \pm 42	7870 \pm 608	25.6	594 \pm 16	125472 \pm 14510	211.1
T. D. F.	728 \pm 137	3647 \pm 506	5.0	694 \pm 210	12700 \pm 1015	18.3
T. T.: W. B.	451 \pm 94	11059 \pm 578	24.5	471 \pm 127	40703 \pm 8672	86.4
T. E. F.	280 \pm 36	4443 \pm 393	15.9	234 \pm 95	28388 \pm 4153	121.3
T. D. F.	146 \pm 20	367 \pm 26	2.5	226 \pm 74	2998 \pm 154	13.3

W. B.: whole blood, T. E. F.: T-cell enriched fraction, T. D. F.: T-cell depleted fraction. Each cpm represent maximum count from 1:2 to 1:256 dilution of CMV antigen.

whole blood (WB), T-cell enriched fraction (TEF), T-cell depleted fraction (TDF) の3つの系を作製し、CMV-LTF 反応を試みたものである。TDF における T cell の混入率は5%未満であった。Macrophage は TDF にあり13%の混入であった。PHA-LTF 反応をみると、TEF と TDF とはよく分離されていることがわかる。

症例 SC では、WB と TEF の反応パターンは似ており、CMV 抗原濃度 1:16 でピークを示した。その SI は、それぞれ、39.8 と 25.6 であった。TDF の反応ピークは、SI=5 であった。症例 TT では、TEF のピークは、CMV 抗原濃度 1:16 で認められた。SI は、WB では、24.5、TEF では 15.9 であった。TDF では SI=2.5 であった。2例の症例とも TEF で圧倒的に高い反応を示したが、WB の示す反応よりは低値であった。これは、PHA-LTF 反応が、WB より TEF において、より高い反応を示すのに比して対照的であった。

3.4 年齢別 CMV-LTF 反応の検討

Fig. 6 は、CMV 既感染群と非感染対照群について、CMV-LTF 反応を年齢別に検討を加えたものである。片対数グラフを用い、縦軸には、各症例の示した最高の SI をプロットした。対照群では、CMV-LTF 反応は陰性であり、SI 値 2 未満であった。

感染群を4つの年齢群に分けた。LTF 試験施行時にウイルスが分離された Donors は、○で、分離されなかった Donors は、●で示した。成人群では分離は試みられなかった。SI を、M \pm 1 SD で示すと、<1 yr=5.7 \pm 3.0、1-5 yr=6.9 \pm 5.7、6-15 yr=36.7 \pm 33.1、Adults=52.6 \pm 55.4 であった。またウイルス分離陽性群のうち、1名で SI=1.8 と低値を、1名が SI=2.0 と境界値を示した。各年齢層で、LTF 反応に差がでてくることが示された。年齢が上昇するにつれて、平均 SI も上昇するが、分散の程度も大きくなっていく。ことに成人群では、その分散の程度は

大きく、SI=10 前後から、200 付近までを示す症例に拡っており、個体間の相違が著明であった。

年齢群の間の平均 SI の差について、CMV 血清抗体陽性、健康成人群との間と、t 検定を試みた。<1 yr 群とでは、t=2.7109 (p<0.025)、1-5 yr との間では、t=2.8742

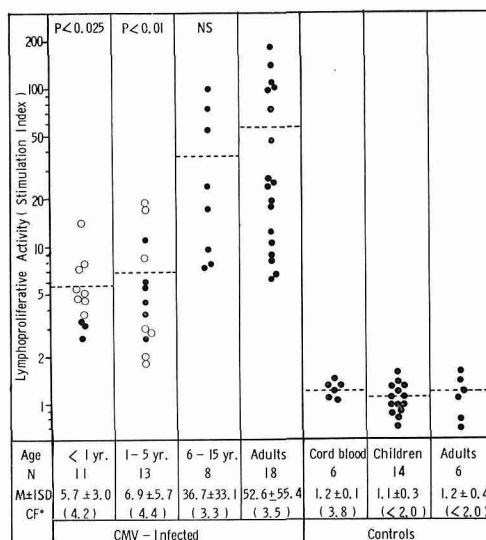


Fig. 6 Cytomegalovirus-Specific Lymphocyte Transformation in the Different Age Groups.

* Geometric mean of complement fixing antibody titer (2ⁿ). Each point represents a sample of lymphocytes from a single case. ○; CMV excretors ●; non-excretors. Horizontal dotted lines represent mean values. Virus isolation was not attempted from adults. Statistical significance was assessed by comparing the response of cells from the children with CMV infection with that of cells from healthy seropositive adults (as determined by Student's t-test). NS; not significant.

Table 6 *Lymphocyte transformation with cytomegalovirus antigen and phytohemagglutinin in virus excretors and seropositive non-excretors*

Group	No. tested	CF titer 2 ⁿ	Mean S.I. \pm 1 SD with	
			CMV	PHA
Excretors	15	4.6	7.3 \pm 5.4	99.5 \pm 37.0
Non-excretors	17	3.5	19.8 \pm 27.7	108.5 \pm 45.9

(P>0.1)

(P>0.1)

($p < 0.01$) で、それぞれ有意差を認めた。6~15 yr との間では、 $p > 0.1$ で有意な差はなかった。

Table 6 には、ウイルス分離を試みた CMV-CF 抗体を保有する症例のうち、分離陽性群と陰性群について LTF 反応を比較検討した成績を示した。CMV-LTF 反応の SI は、分離陽性群では 7.3 ± 5.4 、陰性群では、 19.8 ± 27.7 であり、ウイルス分離陰性群で高い平均 SI を示した。しかし、陰性群における分散の程度は大きく、t 検定では、両者間に有意差を認めなかった。また、両群間の PHA-LTF 反応にも有意差はなかった。

3.5 原発性免疫不全症における CMV-LTF

試験 (Table 7)

B-cell deficiency 5 例および ataxia-telangiectasia 1 例の計 6 例の原発性免疫不全症児について、CMV-LTF 試験を行った。B-cell deficiency の児 (agammaglobulinemia; 4 例, hypogammaglobulinemia with hyper IgM; 1 例) では PHA-LTF 反応は正常に認められた。ataxia-telangiectasia の児 (KK) では免疫グロブリン IgA, IgE を欠如し、PHA-LTF 反応も有意に低下していた。

CMV の血清抗体は、これらの 6 例全例で証明されなかった。しかし、KW と、KK では、尿より持続的にウイ

ルスが分離されており、CMV の感染が明らかであった。他の 4 例ではウイルスは分離されず、その感染の有無は不明であった。

B-cell deficiency の 3 例 (KW, JS, KS) では、CMV-LTF 反応陽性であり、血清抗体が陰性であるにもかかわらず、CMV 特異的細胞性免疫は、正常に作動していることが明らかにされた。このことにより、これらの例での CMV 感染歴を明らかにし得た。ataxia-telangiectasia の例 (KK) では、LTF 反応陰性で、CMV に対する特異的細胞性免疫の欠損が存在することが示された。

3.6 Immunocompromised hosts における

CMV-LTF 試験 (Fig. 7, Table 8)

CMV 血清抗体陽性の 22 症例 (27 検体) の immunocompromised hosts について LTF 試験により細胞性免疫能を検討した。疾患の内訳は、nephrotic syndrome 6 例, leukemia 3 例, malignant lymphoma 4 例, Bechet disease 2 例, histiocytosis X 2 例, その他 5 例であり、いずれも強力な immunosuppressive therapy を経験している。これらの患児について、CMV-LTF 試験を行い、測定された SI を、Fig. 7 に示した。immunocompromised hosts は、4 つの群に分けて検討を加えた。図中、I 群は immunosuppressive therapy を受ける以前の症例であり、immunosuppressive therapy を受けている症例のうち、II 群は 2 カ月未満投与例、III 群は、長期投与あるいは末期状態にある症例である。IV 群は、寛解期にあり、維持療法を受けている時期のものである。I 群で検討を加えることができた 3 例では、いずれも治療が長期化するにつれて CMV-LTF 反応は低下した。II および III 群では、LTF 反応は低値をとり、ことに III 群では、9 例中 6 例までが陰性であった。IV 群では、CMV-LTF 反応は、III 群に比して明らかに高値を示した。

Table 7 *In vitro lymphocyte transformation tests in six patients with primary immunodeficiency*

Cases	Age/Sex	Diseases	Lymphoproliferative Activity					
			Control (cpm; $M \pm 1$ SD)	CMV (cpm; $M \pm 1$ SD)	SI	Control (cpm; $M \pm 1$ SD)	PHA (cpm; $M \pm 1$ SD)	SI
KW 1 yr	M	Agammaglobulinemia	362 \pm 40	9646 \pm 519	26.6	387 \pm 26	41289 \pm 6326	106.7
YK 7 yr	M	Agammaglobulinemia	307 \pm 27	217 \pm 25	0.7	467 \pm 32	34165 \pm 6134	73.2
YS 5 yr	M	Agammaglobulinemia	268 \pm 44	391 \pm 75	1.5	283 \pm 38	17355 \pm 1165	61.3
JS 3 yr	M	Agammaglobulinemia	305 \pm 41	2427 \pm 91	8.0	403 \pm 43	30694 \pm 5725	76.2
KS 3 yr	M	Hypogammaglobulinemia	325 \pm 6	1372 \pm 143	4.2	383 \pm 84	48097 \pm 2143	125.6
KK 4 yr	M	Ataxia-telangiectasia	190 \pm 42	253 \pm 11	1.3	386 \pm 69	7238 \pm 189	18.8

CMV were isolated from urine of KW and KK. SI=stimulation index. Age matched normal control ($M \pm 1$ SD); PHA; SI=97.1 \pm 34.2 ($n=17$), CMV; SI=7.7 \pm 5.9 ($n=15$).

Immunocompromised hosts と同年齢群で免疫学的に正常な、CMV 血清抗体保有群を対照群として、I, II, III, IV 群との間での平均 SI の差について、t 検定を用いて検討した。I 群、IV 群との間では有意差を認めなかったが、II 群とは、 $t=2.7129$ ($p<0.025$) III 群とは、 $t=2.9658$ ($p<0.01$) でもとも有意であった。Table 8 には、II, III, IV 群の CMV-LTF 反応 ($SI=5.5\pm5.4$) と対照群のそれ ($SI=36.7\pm33.1$) とを示した。両者間の平均 SI の差について、t 検定を行ったところ、 $t=4.0126$ ($p<0.001$) で有意であった。

また、I 群と他の各群との間で t 検定を用い平均 SI の差について有意差の検討を行ったところ、II 群とでは、

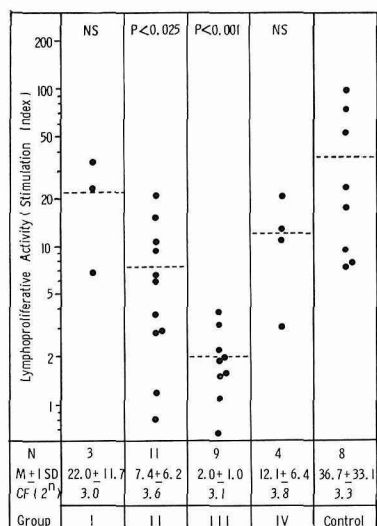


Fig. 7 Comparison of Cytomegalovirus Specific Lymphocyte Transformation in the Immunocompromised Hosts.

I; not-treated, II; on immunosuppressive therapy less than 2 months, III; on prolonged immunosuppressive therapy, IV; in remissive. Horizontal dotted lines represent mean values. Statistical significance was assessed by comparing the response of cells from Control group (as determined by t-test). NS; not significant.

$t=2.920$ ($p<0.025$), III 群とでは、 $t=5.4556$ ($p<0.001$) でいずれとも有意であった。回復期である IV 群とは、有意差を認めなかった。

Immunocompromised hosts における PHA-LTF 反応について、対照群との平均 SI を t 検定した結果、 $t=3.3103$ ($p<0.005$) で有意差を認めた。各群における PHA-LTF 反応の SI は、I 群= 87.9 ± 30.8 ; II 群= 85.6 ± 34.2 ; III 群= 24.3 ± 15.0 ; IV 群= 133.3 ± 31.6 であった。対照群の SI との差の t 検定では、III 群との間では、 $t=3.0873$ ($p<0.025$) で有意な低下を認めたが、I, II, IV 群との間では有意差を認めなかった。

3.7 先天性 CMV 感染児における CMV-LTF 試験

6 例の先天性 CMV 感染症児とその母親について行った LTF 試験の結果を示した (Table 9)。6 例中症状のあった 3 例は、いずれも生直後に TORCH (toxoplasma gondii, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex virus) 症候群⁶²⁾を疑われたが、CMV が分離され、かつ他の感染因子が否定されたものである。すなわち、NM (在胎 40 週、生下時体重 2920 g), IJ (在胎 38 週、生下時体重 3020 g, 羊水混濁), MY (在胎 39 週、生下時体重 2040 g) の 3 例は、生下時に、黄疸、皮下出血、肝脾腫大、血小板減少などの顕著な臨床症状を示した症例であり、特に NM は、生直後より、痙攣、筋緊張低下などの中枢神経症状が著明であった。検査時点においては、IJ および MY は、ほぼ正常児と変らない精神運動機能の発達を認めていたが、NM は、中枢神経障害を残存させており、右半身麻痺、精神運動発達遅延があり、3~4 カ月児相当の発達であった。

SN, JN, YK の 3 例は、生下時に尿よりの CMV 分離陽性であったが、何らの異常な臨床所見をも認めなかった症例である。

LTF 試験時に、同時に試みたウイルス分離では NM, MY, SN, JN, YK で陽性であった。

LTF 試験では、NM と JN とでは SI 値 2 未満で、CMV 特異的細胞性免疫の成立は認められなかった。IJ および MY では良好な反応を示した。ことに MY は、

Table 8 Lymphocyte transformation with cytomegalovirus antigen in immunocompromised hosts

Group	No. tested	CF** titer	Mean S. I. ± 1 SD with	
			CMV	PHA
Immunocompromised host	24	3.4	5.0 ± 5.4	70.3 ± 40.5
Control*	8	3.3	36.7 ± 33.1	135.5 ± 47.7

* Age matched CMV seropositive control (6-15 yr).

** Geometric mean titer (2ⁿ).

($P<0.001$)

($P<0.005$)

Table 9 *In vitro lymphocyte transformation to cytomegalovirus in infants with congenital cytomegalovirus infection and their mothers*

Cases	Symptoms	Antibody titer*	E rosette (%)	Lymphoproliferative response					
				Control** (cpm; M±1 SD)	CMV (cpm; M±1 SD)	S. I.	Control (cpm; M±1 SD)	PHA (cpm; M±1 SD)	S. I.
N. M. 1 yr 2 m M	+	32	62.4	431±32	645±39	1.5	473±5	33864±4021	71.6
Mother		8	ND	250±25	1507±287	6.0	251±20	46719±3217	186.1
I. J. 11 m F	+	32	47.9	2123±109	17212±4646	8.1	3575±62	129828±3348	36.3
Mother		16	ND	157±35	11732±3210	74.7	255±12	51049±464	200.1
M. Y. 3 yr 4 m F	+	16	46.1	468±56	25355±4012	54.1	1143±111	89443±3108	78.3
Mother		8	ND	160±27	23962±6646	149.8	262±7	55923±2195	213.4
S. N. 1 m F	—	16	54.7	519±36	3360±387	6.5	1331±132	194134±8639	145.8
J. N. 1 m F	—	16	57.9	1350±39	2288±332	1.7	849±28	152116±4924	179.4
Mother		8	ND	237±65	4592±166	19.2	264±38	45925±2638	174.0
Y. K. 1 m F	—	8	ND	4644±931	10617±1034	2.3	3200±354	222620±288	69.6
Mother		32	ND	358±112	3631±62	10.1	322±24	76805±273	231.3

* Complement fixing antibody titer. ** Control antigen. S. I.; Stimulation index. ND; Not done. Age matched normal control (M±1 SD): E rosette=62.4±4.5%; CMV, S. I.=5.7±3.0 in <1 yr.; 6.9±5.7 in 1-5 yr.; 57.7±60.7 in adults. PHA, S. I.=91.0±34.3 in <1 yr.; 97.1±34.2 in 1-5 yr.; 135±55.2 in adults.

SI=54.1 と年齢相当の対照と比して高値であった。臨床症状のない SN と YK とでは、CMV-LTF 反応陽性であったが、YK では SI=2.3 と境界値であった。

母親は、全例 LTF 反応陽性であったが、NM と YK の母親では、成人対照群に比して低値であった。

PHA-LTF 試験では、IJ が SI=36.3 と低値であったが、他の症例では異常を認めなかった。

リンパ球の surface marker の検索では、IJ と MY で E-rosette 形成率が、それぞれ、47.9% と 46.1% と低値であった。EAC-rosette は、IJ と MY で、それぞれ 30.5%、28.3% と対照=20.1±6.3% より軽度増加していた。他の症例では特変を認めなかった。

4 考 按

CMV は本邦では広汎に侵透しているウイルスであり、乳児期においては感染後は長期間にわたってウイルスを排泄しつづける点を特徴の一つとする。CMV に対する血清抗体は、比較的速やかに形成されるが、同時にウイルス排泄が停止することはなく、血清抗体価の上昇とウイルス排除との間に一致は認められない¹¹⁾。

CMV や herpes simplex virus など cell-to-cell の感染様式をとるウイルスの排除に対しては、血清抗体は無力であり、特異的細胞性免疫の成立が第 1 義的であることが示唆されていた。細胞性免疫を *in vitro* で検索する手段

としては、著者が用いた LTF 試験の他にも細胞障害試験や macrophage 遊走阻止試験などいくつかあるが、LTF 試験は、比較的簡便で、かつ宿主の細胞性免疫機能を描出するのに適切な方法といえる。従来、標準 mitogen により、細胞性免疫の検索に用いられてきた LTF 試験を Rosenberg ら¹⁾ は、Herpes simplex virus 感染症に応用し、Herpes simplex virus 抗原の添加が、リンパ球 DNA の複製と分裂を開始させることを発見し、これが宿主の特異的細胞性免疫を表現していることを明らかにした。その後 LTF 試験は、いくつかのウイルス感染症において、特異的細胞性免疫を検索する手段として広く用いられて来ている。本研究では、CMV-LTF 試験を用い、CMV 感染症における特異的細胞性免疫の動態を解析したが、実験成績をいくつかの問題点にわけて考察を加える。

4.1 方法論の検討

4.1.1 CMV-LTF 試験の特異性について

抗原は glycine buffer 抽出法によって作製したが、titer は高く、対照抗原との間に明確な抗原性の違いを有している点、および同属の他のウイルス抗原との間に交叉反応を示さなかった点などから、LTF 反応の抗原特異性が確認された。

Tennapel ら²⁴⁾ は、sucrose gradient 比重遠心法を用い、抗原の purification を行ったが、Möller-Larsen ら²⁵⁾ は、CMV 感染細胞と purified antigen とを用い両者に

よる CMV-LTF 反応を比較し、それぞれの反応の間には、大きな差のないことを認めている。しかし、培養細胞成分の混入、リンパ球に毒性を有する可溶性成分を可及的に除去するためにも、ウイルス抗原は、濃縮され、純化されるべきであろう。

全血培養法による CMV-LTF 試験は、実験時間が短縮されること、採血量 (3 ml 以下) が少なくてすむこと、またリンパ球以外の macrophage や lymphokine など細胞性および液性の免疫反応関与物質の存在下での反応であるので、反応は、一層 dynamic に表現されると考えられる点など多くの利点を有している。

CMV-LTF 試験が CMV に対する特異的細胞性免疫を反映していることに関しては、すでにいくつかの報告があるが^{24~28)}、著者の実験においても、その点が明確にされた。個々の症例における LTF 反応をみると、SI=2 を境界値として CMV 感染群と非感染群とを分類することができた。すなわち、SI 値 2 未満の症例では、血清抗体を保有せず (非感染)、血清抗体を保有する症例 (既感染) では、SI 値 2 以上であり、SI=2 を境界値として、特異的細胞性免疫の成立の有無を判定することができた。また一方、臍帯血による検索では、CMV-LTF 反応が、液性抗体の影響を受けず、液性抗体とは別個の機序で作動していることが示された。

4.1.2 CMV-LTF 試験に関与するリンパ球 subpopulation の同定

PHA のような標準 mitogen においては、反応に関与するリンパ球が T-cell であることが明らかにされている^{29,30)} が、ウイルス抗原の場合には必ずしも単純ではないと考えられるので、T-cell、B-cell の両分画について LTF 試験を試みた。Table 5 に示したごとく、2 例の症例とも TEF で高い CMV-LTF 反応を示しており LTF 反応の主体を担う細胞は T-cell であると考えられる。しかし、WB でより高い反応を示していることは、単に T-cell のみならず、B-cell あるいは macrophage など他の因子の存在下での共同作用により、CMV-LTF 反応は、一層増強されることが明らかになった。

in vitro における反応が、*in vivo* における反応と全く同一視されるとは思わないが、全血培養法が、生体内における免疫学的相互関係を最も忠実に投射するものであるのなら、CMV に対する特異的細胞性免疫は、T-cell を中心として他の免疫担当細胞との総合力によって担われていると考えることができよう。

4.2 CMV-LTF 反応の生体内感染防禦に関する意義

4.2.1 CMV-LTF 反応の年齢依存性について

CMV-LTF 反応は、年齢群によって異った反応を示す

ことが明らかにされた。このことは、CMV 特異的細胞性免疫の成立には、年齢依存性があることを考えさせる。すなわち、乳児期に比して学童期以降で有意に高い平均 SI を示すことは、一般的に非特異的細胞性免疫が加齢に伴って低下する事実^{31~33)} あるいは、急性ウイルス感染症の特異的細胞性免疫反応で認められる成績^{34,35)} とは異っており、CMV が潜伏感染あるいは再感染の感染様式をとることと密接に関係していることが推察された。

平均 SI が、年齢群によって異っていることについての宿主要因としては、第 1 に、年齢によって CMV 感染に対する宿主の反応態度が異なること、つまり年齢により、免疫担当細胞に未熟性があることが考えられるし、第 2 には、個体間に免疫遺伝学的差異が存在することも考慮される。年齢が上昇するにつれて SI の分散の程度も大きくなり、成人群においては、SI=10~20 の群と、SI>100 の群とに大別されるが、これらの群の間に、個体間の免疫学的反応態度の違い、初感染時期の相違、あるいは感染後に宿主が受ける種々の増強作用、とくに再感染または再燃の有無などが関与していると考えられる。潜伏していた CMV の再活性化は、妊娠、輸血、graft-versus-host 反応などの引き金によっておこるものと考えられて^{36~38)} おり、SI 高値を示す宿主では、検査時と近接した時点で何らかの引き金により、再燃を経験していることが推測される。

ウイルスの排泄者と非排泄者との比較では、排泄者の SI は、非排泄者より低値であった。しかし、非排泄者での SI の分散は大きく、両者間に有意の差を認めることはできなかった。非排泄者で分散が大きいことの理由は、非排泄者の大多数が年長児であり、先に述べた年長児において示される SI の様相に合致していたためと考えられる。しかし厳密には、排泄者および非排泄者の検索に関しては、CMV 感染のどの時期をとらえているのか、つまり、すでに長期的にウイルス排泄がつづいている時期なのか、初感染の時期なのか、などの違いによって分類され、検討されるべきで一律に排泄者と非排泄者をまとめて比較することでは不十分と思われた。また、一個体について初感染時期から経時的に追跡することも必要であろう。

4.2.2 臨床的特殊例における CMV-LTF 試験

4.2.2.1 原発性免疫不全症

B-cell deficiency では、種痘や水痘、麻疹など、細胞性免疫の関与する感染症は、正常と同様の経過を辿り、免疫が成立するが、化膿性疾患や、ポリオなど、感染防禦機序を液性免疫が担当している感染症に対しては抵抗減弱³⁹⁾を示す。

先に、CMV-LTF 反応を担当するリンパ球 subpopulation の検討においても示したように、CMV-LTF 反応を

担当する細胞の主体が T-cell にあるとすれば、T-cell 機構は健常に保持されている B-cell deficiency の患児では CMV-LTF 反応の成立が予測されたが、5 例の B-cell deficiency の検討を通じて、これが証明された。

ataxia-telangiectasia の児では、その後の経過観察においても、CMV は持続的に排泄されており、しかも CMV-LTF 反応の陽性化は認められていない。しかし、CMV 感染が重症化する気配は認められず、CMV と宿主との静的共存状態が保たれている。本患児で CMV 感染の全身播種、重症化にいたらないのは、他の補完的免疫機序が作動していることが考えられる。

4・2・2 Immunocompromised hosts

Immunocompromised hosts では、細胞性免疫の著明な劣化が認められるが、そのことは、opportunistic infection の病原体による蹂躪を放置することになると考えられ、CMV 感染が、pneumonitis として発症する^{40~43)} ことなどは、よく知られた事実である。従って immunocompromised hosts が示す CMV 特異的細胞性免疫を理解することは、CMV 感染症に対する予防と治療の確立を促進する上で重要と考える。

免疫抑制療法下では、血清抗体の有意上昇から、CMV 潜伏感染の再燃あるいは再感染が高率におこることが報告されている^{44~46)} が、immunocompromised hosts における CMV 特異的細胞性免疫について検討を加えた研究は未だに見当たらない。CMV-LTF 反応の研究成績から、以下の 3 点が示唆された。

第 1 点は、患児の CMV 特異的細胞性免疫は、病期の進行もしくは免疫抑制療法の長期化にともなって低下する。今回の実験系では、全血培養法を用いているので血清中の免疫抑制剤がリンパ球に与える影響、あるいは種々の血清因子の作用も考慮する必要があるが、immunocompromised hosts の示す CMV-LTF 反応は、対照群のとの反応より有意に低値であることが示された。すなわち、PHA-LTF 反応では、免疫抑制剤投与早期には反応の有意な低下は認められないが、CMV-LTF 反応の低下は、免疫抑制療法開始に従属しておこり、進行している。このことは CMV 特異的細胞性免疫の抑制が速やかにおこることであり、すでに CMV に感染している患児では、それが急速に拡大する危険を有していることを示しており、opportunistic infection の感染因子として重要視されることの証明といえよう。

第 2 点は、immunocompromised hosts では、血清抗体と特異的細胞性免疫との間に免疫学的解離が存在することが示された。すなわち、より強力な免疫抑制療法下では血清抗体は保持されているにもかかわらず、CMV-LTF

反応は陰性化する場合が少なからず認められる点である。これは対照群では、CMV-CF 抗体の保有と CMV-LTF 反応が陽性であることは密接に関連していた点と対比して、immunocompromised hosts に特徴的であった。

第 3 点としては、CMV 特異的細胞性免疫は、免疫抑制療法の解除によって復活することが推定された。

以上の 3 点から、immunocompromised hosts における CMV 特異的細胞性免疫の重要性が認識された。免疫抑制療法を積極的に行なわなければならない疾患は多い。immunocompromised hosts に対しては、治療の環境条件の整備や、免疫再建など opportunistic infection としての CMV 感染症に対する治療法の確立が重要と考えられる。

4・2・3 先天性 CMV 感染症

先天性 CMV 感染症は、妊婦の初感染あるいは潜在感染ウイルスの再活性化により、経胎盤的に胎児感染することによって発生するとされており^{47,48)}、中枢神経症状をはじめとして多彩な症状を呈することが知られている。しかし、無症状でウイルスを持続排泄することも多く、年余を経て聴覚障害などの症状が明らかになってくることも少なくない^{49,50)}。免疫学的に未熟な胎児の感染では、後天性感染児とは異なり、CMV 特異的細胞性免疫も特殊な反応様式をとることが推察される。本症児では、血清抗体反応は良好に認められるが、ウイルスの排泄は後天性感染児に比して著しく長期間継続することからも、反応様式の特殊性が示唆される。その観点から著者らは、6 例の先天性 CMV 感染児とその母親について、CMV-LTF 反応を用い、特異的細胞性免疫の解析を試み、若干の新しい知見を得た。

先天性 CMV 感染症児の特異的細胞性免疫機構については、すでに 2~3 の報告^{51~53)} がある。Rola-Pleszczynski ら⁵¹⁾ は、cytotoxicity 試験を用いた検討で、患児における ⁵¹Cr-immune release は正常であったが、患児の母親では、対照群と比して有意に低い反応を示したことを報告している。しかし、cytotoxicity 試験では、細胞障害的に働くリンパ球と標的細胞との間に主要組織抗原の一致がなければ細胞障害性は作動しないことが報告されており^{54,55)} その点からも彼らが用いた持続感染細胞⁵⁶⁾ には問題点がある。また cytotoxicity 試験と LTF 試験とでは、細胞性免疫反応の異った側面をみていることも考慮されなければならない。一方、Gehrz ら⁵²⁾ は、LTF 試験を用い、4 例の先天感染児とその母親について検討を加えている。彼らの検討した患児の CMV-LTF 反応は、全例で SI 値 2 未満であった。母親は 4 例中 3 例で低値を示し、特に次の妊娠中の母親では陰性であった。また Starr ら⁵³⁾ は、

LTF 反応とインターフェロン産生能が同時に低下していることを報告している。

著者の検索した症例では、臨床症状の有無とかわりなく、CMV-LTF 反応陰性の症例と陽性の症例とに分かれた。生下時には、ウイルス排泄を認めた以外に何らの臨床症状をも示さなかった3例のうち2例は、生後1カ月の時点で、すでに CMV-LTF 反応は陽性であり、特異的細胞性免疫の欠損は認められなかった。SN と JN とは一卵性双生児であり、一方はすでに CMV-LTF 反応陽性であり、他方は未だに応答を示さないという矛盾した結果を示したが、更に追跡して検索する予定である。生下時に症状を有した3症例では、神経学的後遺症を有する1例 (NM) のみが LTF 反応の欠損を認めた。

臨床症状の出現の有無には、種々の因子の関与が考えられるが、胎生期の感染時期に大きく左右されると考えられている⁵⁷⁾。生下時に臨床症状を有した症例においても、中枢神経症状を保有せず、その後は順調な発育を経過しているような症例では、胎生の比較的遅い時期の感染と考えられ、早晩免疫能の回復が得られるのであろう。症例 IJ、MY は、特異的細胞性免疫が回復した症例と考えられるし、症例 NM は、ウイルス排除機構を欠如した免疫学的欠損の状態を示している。

一般的に、先天感染症が病原体の株の毒力、感染の時期および胎児あるいは母親の免疫学的特質に規定される以上、先天性 CMV 感染症児における特異的細胞性免疫のとり態度も単純なものではあり得ず、いくつかの要因から導かれた免疫学的 heterogeneity が存在するのは当然のことかもしれない。母親の CMV-LTF 反応も、分娩後比較的早い時期に回復してくるものと考えられる。

次に、非特異的細胞性免疫については、E-rosette 形成率と標準 mitogen に対する反応について、Schauf ら⁵⁸⁾は、CMV 感染により PHA-LTF 反応が抑制されることを述べている。CMV 感染や他のウイルス感染が宿主の細胞性免疫を抑制することは、マウスの実験では、よく知られた事実である^{59~61)}。著者の症例では、IJ と MY において E-rosette 形成率は低下しており、IJ では PHA-LTF 反応も低下していた。しかし、これらの2症例では CMV-LTF 反応の低下は認められなかった。CMV-LTF 反応に関与するリンパ球 subpopulation の同定によって示された結果から考えても、この程度の T-cell の減少は、CMV-LTF 反応には影響を及ぼさないのかもしれない。

本研究において、先天性 CMV 感染症児の示す特異的細胞性免疫は、後天性感染症において形成される免疫学的態度とは異り、特異的細胞性免疫の欠損を示す症例が存在することが示された。今後の症例の検討とともに、個々の

症例について prospective に経時的な特異的細胞性免疫を観察することが必要である。その過程で、transfer factor の使用など、先天性 CMV 感染症児の発生の予防と治療の方策も確立されていくものとする。また今後は、先天性 CMV 感染症を疑われ、確定診断を下し難かった症例に対しても、LTF 試験は、retrospective な診断の有効な手段となりうるのではないかと考えている。

総括および結語

ヒト cytomegalovirus (CMV) 感染症における特異的細胞性免疫の成立と意義について、lymphocyte transformation (LTF) 試験を用いて検索し、以下の結論を得た。解析に供した対象の構成は、1) 50 例の CMV 血清抗体を保有する小児および成人、2) 20 例の CMV 血清抗体陰性の小児および成人と6例の臍帯血、3) 6例の原発性免疫不全症、4) 22例の immunocompromised hosts、5) 6例の先天性 CMV 感染症児と母親であった。

1. PHA-LTF 試験では、原発性免疫不全症の1例、immunocompromised hosts の III 群および先天性 CMV 感染症の1例を除いては、全ての症例で異常を認めなかった。

2. CMV-LTF 試験からは、下記の4点が明らかにされた。

1) 血清抗体陰性の対照群と臍帯血においては、CMV-LTF 反応は認められず、全例で stimulation index (SI) < 2 であった。血清抗体陽性群における CMV-LTF 反応は、1例を除いた全例で SI > 2 であった。平均 SI = 27.9 であった。このことから、SI = 2 を境界値として、CMV 既感染群 (SI > 2)、未感染群 (SI < 2) とに分類できた。

2) CMV-LTF 反応を担うリンパ球 subpopulation の主体は T-cell であった。

3) CMV-LTF 反応には年齢依存性が認められた。すなわち乳幼児期で低値 (平均 SI = 5.7, 6.9) であり、年長児 (平均 SI = 36.7) および成人 (平均 SI = 52.6) では高値を示した。

4) CMV 排泄群 (平均 SI = 7.3) と非排泄群 (平均 SI = 19.8) とでは、排泄群の示す SI が低値であった。

これらの成績から、CMV 特異的細胞性免疫の解析に用いる検索方法として LTF 試験がよい指標になることが示された。

3. 臨床上的特殊例 (原発性免疫不全症、immunocompromised hosts、先天性 CMV 感染症) では、血清抗体と CMV 特異的細胞性免疫との間に免疫学的解離が存在した。

1) 原発性免疫不全症についての検討からは、B-cell deficiency では、液性抗体は検出できないが、LTF 反応は

成立し、これによって感染歴が証明された。細胞性免疫に障害を認める ataxia-telangiectasia では、ウイルス排泄により感染歴は明らかであるのに CMV-LTF 反応は陰性であった。

2) Immunocompromised hosts の検討からは、免疫抑制の強化によって、CMV-LTF 反応は低下する点および免疫抑制療法の解除によって CMV-LTF 反応は復活する点が示された。

3) 先天性 CMV 感染症児についての検討では、CMV-LTF 反応で表現される細胞性免疫には、heterogeneity があること、つまり CMV-LTF 反応陽性例と陰性例の存在が示された。

謝 辞

稿をまとめるにあたり、御指導、御校閲をいただいた、千葉峻三助教授ならびに実験遂行に当って御協力をいただいた教室の諸先生に深く謝意を表します。

また、先天性 CMV 感染症児の検索につき御協力をいただいた九州大学小児科、布上薫先生、名古屋中京病院小児科、水野愛子先生に感謝致します。

なお、本研究の一部は、厚生省特定疾患研究（免疫不全調査研究班、心身障害母体外因研究班）費の助成を受けた。

文 献

1. Rosenberg, G. L., Farber, P. A. and Notkins, A. L.: *In vitro* stimulation of sensitized lymphocytes by herpes simplex virus and vaccinia virus. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 756-760 (1972).
2. Gerber, P. and Lucas, S. J.: *In vitro* stimulation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Cell. Immunol.* **5**, 318-324 (1972).
3. Russell, A. S.: Cell-mediated immunity to herpes simplex virus in man. *J. Infect. Dis.* **129**, 142-146 (1974).
4. Russell, A. S., Maini, R. A., Bailey, M. and Dumonde, D. C.: Cell mediated immunity to varicellazoster antigen in acute herpes zoster (Shingles). *Clin. exp. Immunol.* **14**, 181-185 (1972).
5. Simons, M. J. and Fitzgerald, M. G.: Rubella virus and human lymphocytes in culture. *Lancet* **2**, 937-940 (1968).
6. Chiba, Y., Dzierba, J. L., Morag, A. and Ogra, P. L.: Cell-mediated immune response to mumps virus infection in man. *J. Immunol.* **116**, 12-15 (1976).
7. Yamanaka, T., Chiba, S. and Nakao, T.: Application of microassay technique in cell-mediated immunity to measles virus infection. *Tohoku J. exp. Med.* **120**, 225-229 (1976).
8. Gardner, M. B., Officer, J. E., Parker, J., Estes, J. D. and Rongey, R. W.: Induction of disseminated virulent cytomegalovirus infection by immunosuppression of naturally chronically infected wild mice. *Infect. Immun.* **10**, 966-969 (1974).
9. Olding, L. B., Jensen, F. C. and Oldstone, M. B. A.: Pathogenesis of cytomegalovirus infection. I. Activation of virus from bone marrow-derived lymphocytes by *in vitro* allogenic reaction. *J. Exp. Med.* **141**, 561-572 (1975).
10. Starr, S. E.: Murine cytomegalovirus infection in nude mice. *Clin. Res.* **24**, 69 A (1976).
11. 川村脩子: Cytomegalovirus 初感染における血清中和抗体反応に関する研究. 札幌医誌 **45**, 212-220 (1976).
12. Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L., Firschein, I. L., and Hashem, N.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Science* **142**, 1185-1187 (1963).
13. Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. and Huebner, R. J.: Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 418-424 (1956).
14. Hallauer, C. and Kronauer, G.: Extraction of cell-associated virus without damage of culture. *Arch. ges. Virusforsch.* **15**, 433-440 (1965).
15. Schmidt, N. J. and Lennette, E. H.: Rubella complement-fixing antigens derived from the fluid and cellular phases of infected BHK-21 cells; Extraction of cell-associated antigen with alkaline buffers. *J. Immunol.* **97**, 815-821 (1966).
16. Chiba, S., Striker, R. L. and Benyesh-Melnick, M.: Microculture plaque assay for human and simian cytomegaloviruses. *Appl. Microbiol.* **23**, 780-783 (1972).
17. Junge, U., Hoekstra, J., Wolfe, L. and Deinhardt, F.: Microtechnique for quantitative evaluation of *in vitro* lymphocyte transformation. *Clin. exp. Immunol.* **7**, 431-437 (1970).
18. Han, T. and Pauly, J.: Simplified whole blood method for evaluating *in vitro* lymphocyte reactivity of laboratory animals. *Clin. exp. Immunol.* **11**, 137-142 (1972).
19. Pauly, J. L., Sokal, J. E. and Han, T.: Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens and homologous lymphocytes. *J. Lab. Clin. Med.*

- 82, 500-512 (1973).
20. Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* **136**, 207-215 (1972).
21. Kiskiss, D. F., Chol, Y. S. and Good, R. A.: Some characteristics of human rosette-forming cells. *Birth Defects: Original article series XI*, 12-15 (1975).
22. Sasaki, M., Sekizawa, T., Takahashi, H. Abo, T. and Kumagai, K.: Heterogeneity of human T lymphocytes to bind sheep erythrocytes and mitogenic responses of their subpopulations. *J. Immunol.* **115**, 1509-1514 (1975).
23. 辻 公美: 比重心法によるリンパ球の分離 Conray-400-Ficoll 法. 免疫実験操作法, 443-446, 日本免疫学会編 (1975).
24. Tennapel, C. H. H., The, T. H., Bijker J., Degast, G. C. and Langenhuisen, M. M. A. C.: Cytomegalovirus-directed lymphocyte reactivity in healthy adults tested by a CMV-induced lymphocyte transformation test. *Clin. exp. Immunol.* **29**, 52-60 (1977).
25. Möller-Larsen, A., Anderson, H. K., Heron, I. and Sarov, I.: *In vitro* stimulation of human lymphocytes by purified cytomegalovirus. *Intervirology* **6**, 249-257 (1975/76).
26. Rytel, M. W.: Humoral and cell-mediated immunity to cytomegalovirus infection. *Yale J. Biol. Med.* **49**, 63 (1976).
27. Thurman, G. B., Ahmed, A., Strong, D. M., Knudsen, R. C., Grace, W. R. and Sell, K. W.: Lymphocyte activation in subacute sclerosing panencephalitis and cytomegalovirus infections. *J. Exp. Med.* **138**, 839-846 (1973).
28. Rytel, M. W., Aaberg, T. M., Dee, T. H. and Heim, L. H.: Therapy of cytomegalovirus retinitis with transfer factor. *Cell. Immunol.* **19**, 8-21 (1975).
29. Oppenheim, J. J.: Relationship of *in vitro* lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs and man. *Fed. Proc.* **27**, 21-28 (1968).
30. Hughes, D. and Caspary, E. A.: Lymphocyte transformation *in vitro* measured by tritiated thymidine uptake. *Int. Arch. Allergy* **37**, 506-531 (1970).
31. Pisciotta, A. V., Westring, D. W., DePrey, C. and Walsh, B.: Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature* **215**, 193-194 (1967).
32. Weksler, M. E. and Hutteroth, T. H.: Impaired lymphocyte function in aged humans. *J. Clin. Invest.* **53**, 99-104 (1974).
33. Foad, B. S. I., Adams, L. E., Yamauchi, Y. and Litwin, A.: Phytomitogen responses peripheral blood lymphocytes in young and older subjects. *Clin. exp. Immunol.* **17**, 657-664 (1974).
34. 綿谷靖彦, 千葉靖男, 千葉峻三, 中尾 亨: ムンプス感染症の *in vitro* リンパ球幼若化反応. 医学のあゆみ **104**, 810-811 (1978).
35. 千葉靖男, 中尾 亨, Ogra, P. L.: 風疹細胞性免疫の年齢依存性: ワクチン反応性との関連について. ウィルス **28**, 25-30 (1978).
36. Mirkovic, R., Werch, J., South, M. A. and Benyesh-Melnick, M.: Incidence of cytomegaloviremia in blood-bank donors and in infants with congenital cytomegalic inclusion disease. *Infect. Immun.* **3**, 45-50 (1971).
37. Wu, B. C., Dowling, J. N., Armstrong, J. A. and Ho, M.: Enhancement of mouse cytomegalovirus infection during host-versus-graft reaction. *Science* **190**, 56-58 (1975).
38. Dowling, J. N., Wu, B. C., Armstrong, J. A. and Ho, M.: Enhancement of murine cytomegalovirus infection during graft-versus-host reaction. *J. Infect. Dis.* **135**, 990-994 (1977).
39. Allison, A. C.: Interactions of antibodies, complement components and various cell types in immunity against viruses and pyogenic bacteria. *Transplant. Rev.* **19**, 3-55 (1974).
40. Neiman, P., Wasserman, P. B., Wentworth, B. B., Kao, G. F., Lerner, K. G., Storb, R., Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Fass, L., Glucksberg, H. and Thoman, E. D.: Interstitial pneumonia and cytomegalovirus infection as complications of humane marrow transplantation. *Transplantation* **15**, 478-485 (1973).
41. Spencer, E. S.: Clinical aspects of cytomegalovirus infection in kidney-graft recipients. *Scand. J. Infect. Dis.* **6**, 315-323 (1974).
42. Dowling, J. N., Saslow, A. R., Armstrong, J. A. and Ho, M.: Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Infect. Dis.* **133**, 399-408 (1976).
43. Neiman, P. E., Reeves, W., Ray, G., Flournoy, N., Lerner, K. G., Sale, G. E. and Thomas, E. D.: A prospective analysis of interstitial pneumonia

- and opportunistic viral infection among recipients of allogenic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* **136**, 754-767 (1977).
44. Merigan, T. C. and Stevens, D. A.: Viral infections in man associated with acquired immunological deficiency states. *Fed. Proc.* **30**, 1858-1864 (1971).
 45. Dowling, J. N., Saslow, A. R., Armstrong, J. A. and Ho, M.: The relationship of immunosuppression to cytomegalovirus infection. *Yale J. Biol. Med.* **49**, 77-82 (1976).
 46. 我妻嘉孝: 免疫抑制療法とサイトメガロウイルス感染との関係についての研究. 札幌医誌 **46**, 229-251 (1977).
 47. Krech, U. H., Jung, M. and Jung, F.: Cytomegalovirus infection of man. S. Karger (1971).
 48. Stagno, S., Reynolds, D. W., Huang, E. S., Thames, S. D., Smith, R. J., and Alford, C. A.: Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in an immune population. *New Eng. J. Med.* **296**, 1254-1258 (1977).
 49. Melnick, M. E. and Hanshaw, J. B.: Congenital cytomegalovirus infection. Developmental progress of infants detected by routine screening. *Am. J. Dis. Child.* **126**, 190-194 (1973).
 50. Hanshaw, J. B., Scheiner, A. P., Moxley, A. W., Gaev, L., Abel, V. and Scheiner, B.: School failure and deafness after "silent" congenital cytomegalovirus infection. *New Eng. J. Med.* **295**, 468-470 (1976).
 51. Rola-Pleszczynski, M., Frenkel, L. D., Fuccillo, D. A., Hensen, S. A., Vincent, M. M., Reynolds, D. W., Stagno, S. and Bellanti, J. A.: Specific impairment of cell-mediated immunity in mothers of infants with congenital infection due to cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* **135**, 386-391 (1977).
 52. Gehr, R. C., Marker, S. C., Knorr, S. O., Kalis, J. M. and Balfour, H. H.: Specific cell-mediated immune defect in active cytomegalovirus infection of young children and their mothers. *Lancet* **2**, 844-847 (1977).
 53. Starr, S. E., Tolpin, M. D., Friedman, H. M., Plotkin, S. A. and Pancker, K.: Immune responses in children with congenital cytomegalovirus and their mothers. *Lancet* **2**, 1357 (1977).
 54. Zinkernagel, R. M., Dunlop, M. B. C., Blanden, R. V., Doherty, P. C. and Shreffler, D. C.: H-2 compatibility requirement for virus specific T-cell-mediated cytotoxicity. Evaluation of the role of H-2 region and non-H-2 genes in regulating immune response. *J. Exp. Med.* **144**, 519-532 (1976).
 55. Zinkernagel, R. M.: H-2 restriction of virus specific cytotoxicity across the H-2 barrier. Separate effector T-cell specificities are associated with self-H-2 and with the tolerated allogeneic H-2 in chimeras. *J. Exp. Med.* **144**, 933-945 (1976).
 56. Thong, Y. H., Hensen, S. A., Vincent, M. M., Fuccillo, D. A., Stiles, W. A. and Bellanti, J. A.: Use of cryopreserved virus-infected target cells in a lymphocytotoxicity ^{51}Cr release microassay for cell-mediated immunity to cytomegalovirus. *Infect. Immun.* **13**, 643-645 (1976).
 57. Monif, G. R. G., Egan, E. A., Held, B. and Eitzman, D. V.: The correlation of maternal cytomegalovirus infection during varying stages in gestation with neonatal involvement. *J. Pediatr.* **80**, 17-20 (1972).
 58. Schauf, V., Strelkauskas, A. J. and Deveikis, A.: Alteration of lymphocyte subpopulations with cytomegalovirus infection in infancy. *Clin. exp. Immunol.* **26**, 478-483 (1976).
 59. Schwartz, J. N., Daniels, C. A. and Klintworth, G. K.: Lymphoid cell necrosis, thymic atrophy, and growth retardation in newborn mice inoculated with murine cytomegalovirus. *Amer. J. Pathol.* **79**, 509-522 (1975).
 60. Selgrade, M. K., Ahmed, A., Sell, K. W., Gershwin, M. E. and Steinberg, A. D.: Effect of murine cytomegalovirus on the *in vitro* responses of T and B cells to mitogens. *J. Immunol.* **116**, 1459-1465 (1976).
 61. Boss, J. and Wheelock, E. F.: Progressive inhibition of T-cell function preceding clinical signs of cytomegalovirus infection in mice. *J. Infect. Dis.* **135**, 478-481 (1977).
 62. Nahmias, A., Walls, K., Stewart, J., Flynt, W. and Hermann, K.: The TORCH complex perinatal infections associated with toxoplasma and rubella, cytomegalovirus and herpes simplex viruses. *Pediatr. Res.* **5**, 405 (1971).